

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790165

研究課題名（和文） 外因性の尿酸前駆体物質及び尿酸に対するヒト特異的な
生体防御機構の解明研究課題名（英文） Species-specific transport systems for nucleobases and urate
in small intestine.

研究代表者

井上 勝央（INOUE KATSUHISA）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50315892

研究成果の概要（和文）：外因性の尿酸前駆体物質であるプリン塩基の吸収に関わるトランスポーターとして、ラットより SNBT1 を同定した。SNBT1 は、小腸のみに発現し、Na⁺依存的に核酸塩基や尿酸を輸送することが明らかとなった。また、ヒトなどの高等霊長類において SNBT1 は遺伝的に欠損していた。これらの結果より、ヒトは尿酸分解能力を欠くため、外因性の核酸や尿酸の体内流入を制限する必要がある、その進化の過程で SNBT1 の遺伝子欠損が惹起された可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Nucleobases are important compounds that constitute nucleosides and nucleic acids. Although it has long been suggested that specific transporters are involved in their intestinal absorption, their molecular entities have not been identified in mammals. In the present study, we could successfully identify rat Slc23a4 as the first sodium dependent nucleobase transporter (SNBT1), which is highly and only expressed in rat small intestine. When transiently expressed in HEK293 cells, rat SNBT1 could transport nucleobases such as uracil, thymine, guanine, hypoxanthine and xanthine, as well as urate. It was also found that the gene orthologous to the rSNBT1 gene is genetically defective in humans. This may have a biological and evolutionary meaning in the transport and metabolism of nucleobases and urate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：核酸塩基、担体輸送、トランスポーター、SNBT1

1. 研究開始当初の背景

核酸塩基は、DNA 及び RNA をはじめ、ATP や NAD 等、細胞の正常な機能や増殖に不可欠な様々な物質を構成するヌクレオチドの塩基

成分であり、すべての生体にとって必須の物質である。しかし、その代謝機構は、下等哺乳類動物とヒトでは大きく異なっている。ラットやマウスなどのほとんどの哺乳類では、

プリン核酸塩基はキサンチンオキシダーゼにより urate へ変換された後、urate 分解酵素である uricase によってアラントインに代謝・排泄される。これに対し、ヒトなどの一部の高等霊長類では uricase が欠損しているため、核酸塩基の最終代謝産物は urate である。このことは、ヒトにおいて他の動物種よりも血中 urate 濃度が高く維持されている要因の一つとされている。

一方、urate の素となる核酸の供給経路には、赤芽球から赤血球への分化・成熟の過程における脱核に伴う内因性核酸の生成と食物由来の外因性核酸の吸収があるが、生体内の核酸から urate への変換に関わる代謝酵素群の大半が小腸上皮細胞に局在しているため、外因性の核酸は小腸で urate へと代謝され、血中 urate 濃度の変動要因となり得ることが指摘されている。これまでに、核酸の中でも、ヌクレオシドの吸収に関わる研究は盛んに行われており、その分子実体であるヌクレオシドトランスポーターも同定され詳細に解析されている。一方、核酸塩基の吸収については不明な部分が多く、それに関わるトランスポーターも同定されていないため、ヒトにおける外因性核酸の吸収及びそれら由来の urate の体内流入との関連を解析することは困難な状況であった。

2. 研究の目的

ヒトにおける血中 urate 濃度は、他の哺乳類動物と比較して極めて高く維持されている。その要因とし、腎臓における効率的な urate の再吸収と urate 分解酵素の遺伝的欠損が知られている。したがって、核酸などの外因性核酸の経口摂取は、血中 urate 濃度への大きな変動要因になり得ると推察される。そこで本研究課題において、小腸における外因性 urate 前駆体物質としての核酸塩基及びそれ由来の urate の体内流入を制限するためのヒト特異的な生理的防御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

核酸塩基特異的トランスポーターを同定するため、ヒト及びマウス・ラット染色体ゲノムデータベースの情報をもとに、小腸で高発現し

ている機能未知のトランスポーター様遺伝子の検索を行った。次に、候補遺伝子の cDNA を単離し、ほ乳類発現ベクターである pCI-neo vector に組み込んで HEK293 細胞に一過性に発現させ、 $[^3\text{H}]$ uracil の細胞内取り込み輸送活性を評価した。これにより、uracil 輸送活性を有するトランスポーターとして、SNBT1 (sodium-dependent nucleobase transporter 1)を見出した。その機能特性を明らかにするため、MDCK II 細胞を用いて SNBT1 安定発現株を作製し、様々な核酸塩基及び urate を基質としての機能解析等や分化させた MDCK II 細胞における GFP-SNBT1 の細胞内局在の評価も行った。

また、*in vivo* における SNBT1 の生理的役割を明らかにするために、ラット小腸組織を用いた反転腸管における核酸塩基の吸収輸送実験も行った。

4. 研究成果

ラット小腸よりクローニングした SNBT1 (rSNBT1) を HEK293 細胞に一過性に発現させ、uracil の取り込みを評価した結果、mock 細胞と比べ、高い輸送活性が認められた。特に核酸塩基また rSNBT1 は、他の基質と比べ uracil において高い輸送活性を有していた。そこで、以降の実験では uracil をモデル基質として使用した。時間依存性について考慮したところ、uracil 輸送は 2 分まではほぼ直線的に増加することが確認された。したがって、この時間範囲内において uracil の取り込み初速度の評価が可能であると考え、以降の実験では取り込み時間を 1 分間とした。rSNBT1 による uracil 輸送は顕著な濃度依存性を示し、uracil に対するミカエリス定数 (K_m 値) は 21 μM 、 V_{\max} 値は 737 pmol/min/mg protein であった。また、プリン骨格を有する xanthine について解析を行った結果、 K_m 値は 83 μM 、 V_{\max} 値は 1110 pmol/min/mg protein であった。uracil に対する親和性の方が高いものの、最大輸送速度は xanthine の方が高く、どちらも rSNBT1 の良好な基質であると考えられた。一方、興味深いことに、核酸塩基の代謝物である urate についても顕著な取り込みが認められ、速度論的解析により、その K_m 値は 433 μM 、 V_{\max} 値は 1.32 nmol/min/mg protein と算

出された (Fig. 1)。この K_m 値は、uracil に対する K_m 値 (21.2 μM) に比べて著しく大きく、uracil に比べて urate の親和性は低いことが示唆された。トランスポーターによる輸送の効率は K_m 値を大きく下回る低濃度域で最大となり、 V_{\max}/K_m 値であらわされる。この値を比較すると、urate 輸送では 3.05 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein であり、uracil 輸送での値 (33.5 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein) の 1/10 程度であった。

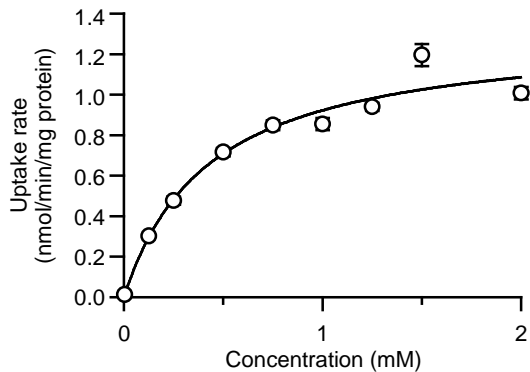


Fig. 1 Concentration Dependence of Urate Uptake by rSNBT1 Stably Expressed in MDCKII Cells. Mean \pm S.E. (n = 4); specific uptake of [^{14}C]urate for 2 min at 37°C and pH 7.4; the computer-fitted parameters with S.E. (n = 9).

次に駆動様式について検討するため、細胞外イオンの影響について検討した。取り込み溶液中の Na^+ を K^+ あるいは choline に置換すると、rSNBT1 発現細胞においてのみ、uracil 取り込みの著しい低下が認められた。また、 NaCl を mannitol に置換した場合も同様であった。したがって、SNBT1 は Na^+ 依存的メカニズムで uracil を輸送することが明らかとなった。同様に urate についても同様の検討を行ったところ、 Na^+ 依存が確認できた。このことから輸送駆動力は基質の荷電の有無に関わらず、 Na^+ 勾配を利用することが示唆された。

次に uracil 輸送に対する各種核酸塩基の影響について検討を行った。各種核酸塩基の濃度依存的阻害について検討したところ、thymine の IC_{50} 値は 16.3 μM 、hypoxanthine の IC_{50} 値は 21.3 μM 、guanine の IC_{50} 値は 74.6 μM と算出された。これらの IC_{50} 値は uracil に対する K_m 値に比較的近く、親和性に大きな差はないものと考えられた。また、cytosine に関しては阻害効果を全く示さなかった。同様に rSNBT1 による urate 輸送に対する各種核酸

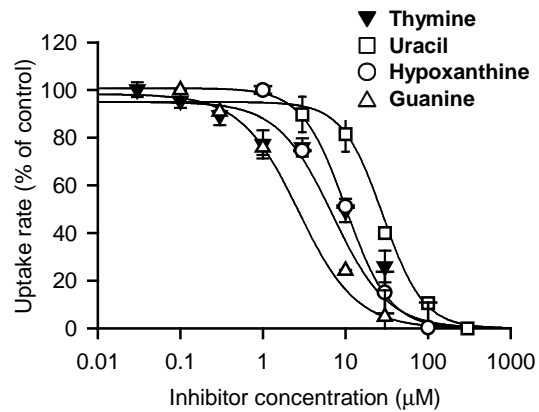


Fig. 2. Inhibitory Effect of Various Compounds on Urate Uptake by rSNBT1 Stably Expressed in MDCKII Cells. Mean \pm S.E. (n = 4); specific uptake of [^{14}C]urate (4 μM) for 2 min at 37°C and pH 7.4; the computer-fitted parameters with S.E. (n = 5 - 8); uptake rate in the absence of inhibitor (control), 6.81 ± 0.21 pmol/min/mg protein.

塩基の影響について検討した結果、uracil の IC_{50} 値は 28.4 μM であり、uracil 輸送の K_m 値とほぼ一致していた。hypoxanthine と thymine は uracil よりもさらに低い IC_{50} 値を示したが (10.1 μM 、8.8 μM)、やはり uracil 輸送に対するそれぞれの IC_{50} 値 (17.4 μM 、12.7 μM) に比較的近い値となっていた。guanine については、urate 輸送に対する IC_{50} 値 (2.7 μM) が uracil 輸送に対する IC_{50} 値 (80.7 μM) と大きく異なっていた。その原因は不明であり、検討の余地があると考えられる。

次に uracil 輸送に対する各種化合物の影響について検討した。ヌクレオシドである adenosine、guanosine、cytidine、thymidine、uridine は阻害効果を示さないか、ごく弱い阻害効果を示す程度であった。ヌクレオシドトランスポーターの代表的な阻害剤では、dipyridamole が中程度の阻害効果を示した他は、NBMPR、papaverine とともに全く阻害効果を示さなかった。rSNBT1 はヌクレオシドトランスポーターと異なる基質認識性を持っていることが推測された。また、核酸塩基類似化合物についても検討を行った。5-fluorouracil、oxypurinol で顕著な阻害効果が認められたが、allopurinol、azathiopurine、purine は uracil 輸送に全く影響せず、mercaptapurine の阻害効果も中程度であった。adenine を基質とせず urate を基質とする点や cytosine が阻害効果を示さないことを考慮すると、rSNBT1 の基質認識には、pyrimidine 環の 6 位の炭素

と酸素間の二重結合 (purine 環も同様) が重要であることが示唆された。

Northern blot 法及び RT-PCR 法を用いて rSNBT1 の臓器分布を検討した結果、小腸に高発現していることが明らかとなった。また、その小腸内分布について検討したところ、小腸下部において高発現していることが明らかとなり、この発現分布パターンはラット小腸における各部位での核酸塩基吸収と一致するものであった。

rSNBT1 のヒトオミログについて検討した。ヒトゲノム上で rSNBT1 と相同性のある塩基配列を検索し、hSNBT1 をコードしている可能性がある領域を見出した。しかし、rSNBT1 の 6、7、8 番目のエキソンに相当する領域を見つけることができなかった。そこで、この領域に相当する hSNBT1 の mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。genomic DNA を鋳型とした検討では 6.9 Kbp にバンドが確認できたのに対し、ヒト小腸由来の cDNA を鋳型とした場合はバンドは検出できなかった。これにより、SNBT1 はヒトにおいて遺伝的に欠損している可能性が示唆された。

一方、ラット小腸では rSNBT1 が高発現しているため、臓器レベルにおいても Na⁺依存性核酸塩基や urate の輸送現象が期待される。そこで、ラット反転腸管を用いて、uracil 及び urate の輸送を評価した。その結果、ラット腸管組織において顕著な Na⁺依存性 uracil 輸送が確認でき、その輸送特性は rSNBT1 とほぼ一致したことから、ラット小腸における核酸塩基の吸収には rSNBT1 が主に関与していることが示唆された。しかし、ラット小腸における urate の輸送を検討したところ、その輸送活性を検出することはできなかった。したがって、urate の小腸における吸収機構には他の因子が関与している可能性が考えられる。最近、BCRP が、近年、痛風の原因遺伝子の一つとして、また GLUT9 が高尿酸血症の原因遺伝子の一つとして同定され、これらが共に urate 排出トランスポーターとしての機能を有することが報告されている。そこで、腸管組織レベルでの urate 排出トランスポーターの役割を検証するため、排出トランスポーターの特異的阻害剤の urate

に及ぼす影響を検討した。なお、GLUT9 の特異的阻害剤は同定されていないため、ここでは BCRP の特異的阻害剤(ko143)の影響のみを検討した。小腸に urate の取り込みと排出に関わるトランスポーターが共存する場合、その排出トランスポーターが阻害された場合、urate 取り込みの上昇が期待される。そこで、ko143 (10 μM) 存在下におけるラット反転腸管での urate 輸送を評価したが、ko143 の有無にかかわらず、urate 取り込みはみられなかった。また、HEK293 細胞に一過性発現させた rSNBT1 による urate 取り込みに対する ko143 の影響はなく、rSNBT1 に対する ko143 の阻害作用はないことが確認された。また、rSNBT1 と BCRP を共発現させた際に ko143 を加えると urate 輸送活性が上昇し、ko143 は BCRP の阻害剤として十分機能していると示唆された (Fig. 3)。これらの結果から、腸管での urate 排出トランスポーターとしての BCRP の役割は大きくない可能性が考えられる。

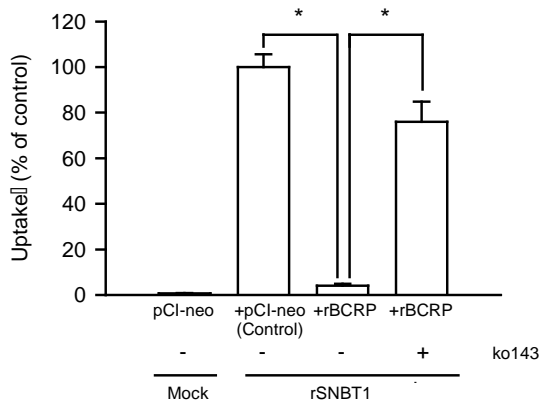


Fig. 3. Effect of ko143 on Urate Uptake in HEK293 Cells Transiently Expressing rSNBT1 and rBCRP. Mean \pm S.E. (n = 4); uptake of [¹⁴C]urate (4 μM) for 30 min at 37°C and pH 7.4; ko143 (specific inhibitor to BCRP) concentration, 10 μM, control, 673 pmol/30 min/mg protein; * p < 0.05.

一方、特異的阻害剤がないために rGLUT9 阻害の効果を検討することができなかったが、HEK293 細胞を用いた遺伝導入発現系において、BCRP よりも強い urate 排出効果を示した GLUT9 が腸管組織での urate 排出においても大きく関与している可能性が考えられる。あるいは、他の urate 排出トランスポーターの関与の可能性も否定はできない。

以上のように新規核酸塩基トランスポーターとしてラット小腸に特異的に発現する

SNBT1 の同定に成功した。これは哺乳類における初めての核酸塩基に特異的なトランスポーターである。また、核酸塩基だけでなく urate に対する輸送活性も有することを見出した。rSNBT1 はラット小腸組織における核酸塩基吸収の分子の実体として機能していることを明らかとした。しかし、腸管組織では urate 取り込みはみられず、rGLUT9 あるいは他の urate 排出トランスポーターの関与により取り込みが抑制されていることが示唆された。一方で、小腸には核酸塩基代謝酵素が多く存在し、urate が多量に生成していると考えられている。血中 urate 濃度の低いラットでは、rSNBT1 を介して取り込まれた核酸塩基が代謝され urate に変換された後、血中へ供給されることは、生理的に重要な役割をもっているものと考えられる。また、urate の再取り込み系としての rSNBT1 の役割が期待される場合も有り得ると思われる。一方で、uricase を欠損し、血中 urate 濃度の高いヒトでは、小腸上皮由来の urate への依存度は低いものと推察される。また、腸管腔への排出方向の urate 輸送が重要となっており、SNBT1 による urate 再取り込み系も、むしろ無駄な機構としての性格を強く持つものと思われる。このために、SNBT1 には核酸塩基を取り込むという有用性があるにも関わらず、ヒトなどの高等霊長類では、その遺伝子欠損がおこったのではないかと考えられる。

以上、腸管での urate 動態の種差に関する有益な情報を得ることができた。今後、さらにラット及びヒトでの urate 動態の解明が進み、urate 関連疾患の治療薬開発や薬物療法の向上に役立つことを期待したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Yamamoto S, Inoue K, Murata T, Kamigaso S, Yasujima T, Maeda JY, Yoshida Y, Ohta K, Yuasa H: Identification and functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals: implication in the species difference in the intestinal absorption mechanism of nucleobases and their analogs between higher primates and other mammals. *J Biol Chem*,

285, 522 - 531, 2010.

2. Fujimura M, Yamamoto S, Murata T, Yasujima T, Inoue K, Ohta K, and Yuasa H: Functional characteristics of the human ortholog of riboflavin transporter 2 and riboflavin-responsive expression of its rat ortholog in the small intestine indicate its involvement in riboflavin absorption. *J Nutr*, 140, 1722 - 1727, 2010.

3. Yasujima T, Ohta K, Inoue K, Yuasa Y: Characterization of human OCT1-mediated transport of DAPI as a fluorescent probe substrate. *J Pharm Sci*, 100, 4006 - 4012, 2011.

[学会発表] (計 4 件)

井上勝央, 核酸塩基トランスポーター1による urate 輸送と小腸における urate 動態への関与: 日本薬学会、132 年会、2012 年 3 月 31 日、札幌

Inoue K, Molecular mechanism of intestinal nucleobase transport in mammals. The 14th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, PP11, 2011. 2. 20, Tokyo.

Nishijima C, Inoue K et al. Urate transport by SNBT1: implication in the intestinal disposition of urate. 薬物動態学会、26 回年会、2012 年 11 月 22 日、広島

Nishijima C, Inoue K et al. Identification of a novel function of SNBT1 as a sodium-dependent urate transporter. North American ISSX, 17th., 2011. 10. 18, Atlanta, Georgia

[図書] (計 2 件)

井上勝央: 核酸のトランスポーター: 「栄養・食品機能とトランスポーター」竹谷豊、薩秀夫、伊藤美紀子、武田英二編建帛社、東京、pp. 121-144、2011.

井上勝央, 湯浅博昭: 核酸輸送体. G. I. Research, 19, 426 - 432, 2011.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 勝央 (INOUE KATSUHISA)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 50315892